

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 03-251763

(43)Date of publication of application : 11.11.1991

(51)Int.CI.

G01N 33/53

(21)Application number : 02-304741

(71)Applicant : MEIDENSHA CORP
CHUGAI PHARMACEUT CO LTD

(22)Date of filing : 09.11.1990

(72)Inventor : OOSAWA NAKAAKI
YOKOYAMA KAZUE
AOYANAGI SHIGEO
KAMAIKE SHINICHI

(30)Priority

Priority number : 01292973 Priority date : 10.11.1989 Priority country : JP

(54) METHOD AND KIT FOR MEASURING CYTOKININ

(57)Abstract:

PURPOSE: To measure the concn. of a trace of cytokinin in blood of a healthy person with high sensitivity by using an anti-cytokinin antibody subjected to affinity purification to immobilize the same on a solid phase and measuring cytokinin by chemoluminescence method or a bioluminescence method.

CONSTITUTION: A column is packed with a substance having strong biological affinity to an objective component and a liquid mixture containing the objective component is allowed to flow in the column and a predetermined chemical agent is injected in the column to recover the objective component which is, in turn, subjected to affinity purification to obtain the anti-cytokinin antibody immobilized on a solid phase. After cytokinin being an antigen is bonded to the anti-cytokinin antibody, a labelled antibody to which a label substance bonded is bonded to cytokin bonded to the antibody on the solid phase. Next, the label substance of the labelled antibody is subjected to luminescence if necessary by other reagent. A measuring limit is lowered by the use of the antibody subjected to affinity purification treatment. The quantity of light in luminescence reaction is measured to make it possible to indirectly measure the concn. of cytokinin. As the solid phase to be used, polyethylene beads are designated.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision
of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

⑫ 公開特許公報 (A)

平3-251763

⑬ Int.Cl.⁵

G 01 N 33/53

識別記号

府内整理番号

P 7906-2J

⑭ 公開 平成3年(1991)11月11日

審査請求 未請求 請求項の数 6 (全9頁)

⑮ 発明の名称 サイトカインの測定方法及びその測定用キット

⑯ 特願 平2-304741

⑰ 出願 平2(1990)11月9日

優先権主張 ⑯ 平1(1989)11月10日 ⑯ 日本(JP) ⑯ 特願 平1-292973

⑯ 発明者	大澤 仲昭	大阪府三島郡島本町水無瀬2-2-2-507
⑯ 発明者	横山 和枝	神奈川県相模原市東林間6-6-28
⑯ 発明者	青柳 重夫	東京都新宿区須賀町11-7
⑯ 発明者	蒲池 信一	東京都保谷市新町5丁目17番31号
⑯ 出願人	株式会社明電舎	東京都品川区大崎2丁目1番17号
⑯ 出願人	中外製薬株式会社	東京都北区浮間5丁目5番1号
⑯ 代理人	弁理士 志賀 富士弥	外1名

明細書

0.3 μg / ml ~ 10 μg / ml のアフィニティ精製

1. 発明の名称

サイトカインの測定方法及びその測定用キット

2. 特許請求の範囲

(1) サイトカインに、固相に固定化された抗サイトカイン抗体と標識物質で標識した抗サイトカイン抗体をそれぞれ抗原抗体反応を利用して結合させた後、前記標識物質を検出手段により測定し、該標識物質の濃度に対応してサイトカインの濃度を測定して成る方法において、

前記固相に固定化された抗サイトカイン抗体が、アフィニティ精製されたものであり、前記検出手段が発光法であることを特徴とするサイトカインの測定方法。

(2) 固相に固定化された抗サイトカイン抗体が、

された抗サイトカイン抗体の緩衝液に固相を浸漬して調製されたものから成ることを特徴とする請求項(1)項記載のサイトカインの測定方法。

(3) 検出手段が、化学発光法又は生物発光法であることを特徴とする請求項(1)項記載のサイトカインの測定方法。

(4) サイトカインと固相に固定化されたアフィニティ精製される抗サイトカイン抗体とをリン酸緩衝液中で、かつ振とう状態で反応させることを特徴とする請求項(1)項記載のサイトカインの測定方法。

(5) 固相への固定化用のアフィニティ精製処理された抗サイトカイン抗体、発光検出を可能とする標識物質で標識した抗サイトカイン抗体、必要

に応じ標準抗原たるサイトカイン、標識酵素用基質、および緩衝液等からなるサイトカイン測定用キット。

(6) 発光検出が、化学発光法又は生物発光法に基づく検出であることを特徴とする請求項(5)項記載のサイトカイン測定用キット。

3. 発明の詳細な説明

A. 産業上の利用分野

本発明は、サイトカインの測定方法及びその測定用キットに関するものであり、さらにくわしくは、極微量のサイトカインを高感度に測定する方法及びその測定用キットに関するものである。

B. 発明の概要

本発明は、サイトカインに、固相に固定化されたアフィニティ精製処理抗サイトカイン抗体と標

殖するマクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)、顆粒球もマクロファージも両方形成する顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、顆粒球、マクロファージとそれらの前駆体細胞である多能性骨髄幹細胞を増殖するマルチ・コロニー刺激因子などがある。

またILにはヘルパーT細胞からのT細胞増殖因子の産生を誘導することを主機能とするIL-1、T細胞を増殖する働きのあるIL-2、肥満細胞や血流幹細胞の増殖因子であるIL-3、IgG型とIgE型の抗体を特異的に生産させる因子であるIL-4、抗体を生産するB細胞の増殖と分化を誘導する因子であるIL-5、さらにB細胞を増殖せずに分化を誘導し、抗体の生産を促進する因子であるIL-6などが挙げられる。

識物質で標識した抗体を、それぞれ抗原抗体反応を利用して結合させた後、標識物質を化学発光法あるいは、生物発光法などの発光方法により測定し、その濃度に対応したサイトカインの濃度を測定することにより、極微量のサイトカインの測定を可能としたものである。

C. 従来の技術

サイトカインは、リンパ球もしくは非リンパ球由来の生理活性物質で細胞の分裂や増殖あるいは抑制などさまざまな生物活性を有する。

サイトカインには種々の因子が含まれており、例えば、コロニー刺激因子(CSF)やインターロイキン(IL)などが知られている。CSFには顆粒球系を分化増殖する顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)の他にマクロファージを分化増

殖するマクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)、顆粒球もマクロファージも両方形成する顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、顆粒球、マクロファージとそれらの前駆体細胞である多能性骨髄幹細胞を増殖するマルチ・コロニー刺激因子などがある。

サイトカインは生体内では極微量にしか存在していないが免疫調節等に深く影響をおよぼす因子である。それゆえ、サイトカインは生体の異変によって、極微量の範囲内ではあるがその生体中の濃度が増減することが知られている。従って、サイトカインの濃度を測定することにより、生体の状況を適確に知得することは可能であり、病気の予防および治療の効果の確認等が期待されている。

また、サイトカインの測定は、サイトカインを薬剤として生体内に投与する場合に、その投与量を予め判断することにも有益である。

D. 発明が解決しようとする課題

上記の点より、サイトカインの臨床的意義を明らかにすることは重要であり、その際に健康人の

血中のサイトカイン値を測定することが必要となる。

たとえば、G-CSFについては、アフィニティ精製処理されていない抗G-CSF抗体と比色法の組み合わせに基づく測定キットが市販され、検出限界が $1,000 \text{ pg}/\text{ml}$ の感度まで測定が可能となっている。

しかしながら、サイトカインの健康人の血中の濃度は、数 pg/ml であると言われており、現在のところ健康人の測定ができるような高感度測定法がなく、そのためサイトカインの臨床的意義は未だ不明で実用的な臨床応用もできなかった。

E. 課題を解決するための手段

本発明は、化学発光法あるいは生物発光法などの発光方法で測定するとともに、その際測定に使

イニティ精製処理、抗サイトカイン抗体および発光検出を可能とする標識物質で標識した抗サイトカイン抗体からなる測定用キットである。その他必要に応じて検量線作成の各種濃度の標準抗原たるサイトカインおよび標識物質を酵素とした場合に必要な酵素用基質、さらに抗原抗体反応時に必要な緩衝液等を当該キットに付加することができる。また固相として、ピーズ、プレート、チューブも添付できる。なお、本発明の測定用キットの構成成分の容量、濃度については目的に応じて適宜定めることが可能である。

F. 作用

(1) 抗体のアフィニティ精製は、目的とする成分とアフィニティ（生物学的親和性）が強い物質をカラムに詰めておき、目的成分を含む混合液

用する固相に固定化された抗サイトカイン抗体にアフィニティ精製されたものを使用することにより、

さらに、好ましくは、固相の浸漬液濃度を特定の範囲として、固相に固定化される抗サイトカイン抗体を調製することにより、

あるいは、固相に固定化された抗サイトカイン抗体と、サイトカインをリン酸緩衝液中で、かつ振とう状態で抗原抗体反応を行った後、標識物質を標識した抗サイトカイン抗体を反応させることにより、高感度なサイトカインの測定方法を提供するものである。

また、本発明は前記のサイトカインの高感度の測定方法を実施するための測定用キットを提供するものである。即ち、固相への固定化用のアフ

を流し込み、カラム内に残った目的成分を取り外す役割をもつ薬品を次工程で流し込んで、目的成分を回収する方法である。

アフィニティ精製することにより抗サイトカイン抗体は、サイトカインに特異的結合するのみを取り出して使用することができ、これに起因して、抗原との親和力が高められ、発光方法による高感度な測定を行うことができる。

(2) 固相に固定化された抗サイトカイン抗体を得る際、固相は、アフィニティ精製抗サイトカイン抗体の濃度が $0.3 \sim 1.0 (\mu\text{g}/\text{ml})$ の緩衝液に浸漬される。

これは、後の実施例2の第2図からも明らかなように、上記濃度範囲外では、発光法による測定の検出限界が上昇してしまい、数 pg/ml 以下、

特に $5 \text{ pg}/\text{ml}$ 以下の検出が困難となるからである。

なお、固相に抗体を固定化する方法は、物理的な吸着、あるいはグルタルアルデヒド法、ポリリジン法などの化学的結合方法など、従来の方法を使用することができる。

ここで使用する固相は、一般に使用されているピーズ、プレートまたはチューブを用いることができ、その材料としてはポリスチレン、ポリエチレンなどのプラスチック、ガラス、その他のものを使用することができる。

(3) 本発明のサイトカインの測定は次のように抗原抗体反応と発光方法により行われる。

① まず、固相に固定化された抗サイトカイン抗体（以下、固相抗体。）に抗原であるサイト

に低濃度の検出を行うことができるからである。

また、振とうにより均一でしかも十分な、特異的な結合が得られる。

(4) 上記の発光方法には、化学発光方法および生物発光方法が含まれ、下記の反応式に従って発生する光量を計測してサイトカインの濃度が測定される。

① 発光法により直接的に測定されるのは、標識物質であり、標識物質は、抗サイトカイン抗体に標識される物質をいう。またそれ自身 $10^{-10} \text{ mol}/\text{ml}$ 程度まで検出可能なものであり、しかも、抗サイトカイン抗体に標識された際、その活性度が低下しないものが好ましい。

② 検出手段として生物発光法を使用する場合には、標識物質は基質との反応により、直接発

カインを結合させた後、この固相抗体に結合したサイトカインに、標識物質を標識した抗サイトカイン抗体（以下、標識抗体。）を結合させる。

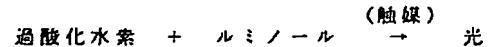
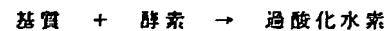
② 次に、サイトカインに結合した標識抗体の標識物質および必要に応じ、他の試薬を用いて発光させる。なお、標識抗体については、アフィニティ精製された抗体である必要はないがより測定限界を低下させるためにはアフィニティ精製処理抗体を使用するのが好ましい。

③ ②の発光反応により発生する光量を測定し、間接的にサイトカインの濃度を測定する。

上記固相抗体とサイトカインとの反応は、リン酸緩衝液中で、しかも振とう状態で行うことが好ましい。後述の実施例にも示す通り、他の緩衝液、例えば、ホウ酸緩衝液を使用したときより、さら

光するホタルルシフェラーゼのような酵素を使用する。

また化学発光法を使用する場合には、標識物質は、アクリジニウムエステル、イソルミノール誘導体、ジオキシセタン誘導体などの化学発光物質を、あるいは例えば以下の式により間接的に発光を行うグルコースオキシターゼ（以下、G O D）のような酸化酵素を使用することができる。



なお、触媒には、フェリシアン化カリウム、ペルオキシターゼなど通常の化学発光法に使用されるものを使用することができる。

G. 実施例

次にサイトカインを例示して、実施例を記述す

るが本発明は、これらの実施例に何ら限定されるものではない。

実施例 1

(A) 抗 G - C S F 抗体のアフィニティ精製

処理

C N B r - セファロース 4 B (ファルマシア社製) に G - C S F をカップリングさせたものを充てん剤とし、カラムに G - C S F の抗血清の溶液を流し込み、カラム内に残った抗 G - C S F Ig G を回収して、この抗 G - C S F Ig G から抗 G - C S F F (a b')₂ および抗 G - C S F F a b'を得た。

(B) 固相抗体の調製

① 上記 (A) でアフィニティ精製された抗 G - C S F F (a b')₂ あるいはアフィニティ精

を加え、G O D にマレイミド基を導入する。

② (i) 上記 (A) で得られたアフィニティ精製された抗 G - C S F F a b' およびアフィニティ精製されていない抗 G - C S F F a b' を含むリン酸緩衝液 (0.1 mol/l, pH 6.0) に β -メルカプトエチルアミン 1.1 mg、EDTA 5 μmol/l 含む 0.1 mol/l リン酸緩衝液 (pH 6.0) を加えて、37°C の温度で搅拌を行った。

(ii) 次にセファデックス G - 25 を充てんした P D - 10 カラム (ファルマシア社製) で脱塩を行った。

③ G O D 標識抗 G - C S F 抗体の調製

(i) ①のマレイミド化 G O D 3 mg を含む 0.1 mol/l リン酸緩衝液 (pH 6.0) に ②の抗 G - C S F F a b' 5.4 μg を含む 0.1 mol/l リ

製されていない抗 G - C S F F (a b')₂ を含むホウ酸緩衝液 (pH 8.5) 中に、固相としてポリスチレンビーズ ($\phi = 6.5 \text{ mm}$) を浸漬し、一晩静置した。

② 次に ①の固相をウシ血清アルブミン (B S A) を含むホウ酸緩衝液で洗浄して、アフィニティ精製された抗 G - C S F F (a b')₂ あるいはアフィニティ精製されていない抗 G - C S F F (a b')₂ の固相抗体を得た。

(C) 酵素標識抗体の調製

標識物質として G O D を用い、マレイミド法により調製を行った。すなわち、

① マレイミド化

G O D を含む 0.1 mol/l のリン酸緩衝液 (pH 7.0) に架橋剤を含むジメチルホルムアミド溶液

を加え、

(ii) さらに 0.1 mol/l リン酸緩衝液 (pH 6.0) を加える。30°C の温度で搅拌を行い、4°C で静置する。

(iii) 上記 (ii) の混合溶液を TSK G 3000 SW (東ソー社製) カラムで精製し、G O D 標識抗 G - C S F 抗体を得た。

(D) 上記 (B) で得た固相抗体および (C) で得た G O D 標識抗体を用いて、次の手順で抗原抗体反応を行った後、化学発光法により G - C S F の検出限界を測定した。

① G - C S F 溶液に上記 (B) で得た固相抗体を添加した。

② さらにリン酸緩衝液 (pH 7.0) を加え、固相抗体と、G - C S F との抗原抗体反応を行っ

た。

③ 次に固相を洗浄し、(C)で得たGOD標識抗体を加えて固相に結合しているG-CSFと抗原抗体反応を室温で行った。

④ さらに③の固相を洗浄し、別の試験管に移し 0.5 mol/l のグルコースを添加し、標識酵素のGODと反応させた。

⑤ ④の溶液に 0.15 N のHClを加えた後サンプリングを行い、この溶液に $2 \times 10^{-7}\text{ mol/l}$ ルミノール溶液および $6 \times 10^{-3}\text{ mol/l}$ のK₃Fe(CN)₆溶液を加え、16S～45S後の発光量をルミノメータ（明電舎製）で測定し、G-CSFの検出限界を測定した。

⑥ 結果を第1表および第1図に示す。なお比較のため、比色法による測定結果をも第1表に

示す。この場合、標識酵素として、比色法においては、GODより感度がよいといわれている西洋ワサビペルオキシターゼ(HRP)を使用した。

第1表

試験 No.	固相抗体	標識抗体	濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	検出限界 ($\mu\text{g/ml}$)
実施例	77I(ニティ)ヤギFab'(ab') ₂	77I(ニティ)ヤギFab'-GOD	健常	5
	77I(ニティ)ヤギFab'(ab') ₂	77I(ニティ)ヤギFab'-GOD	"	5
	77I(ニティ)ヤギFab'(ab') ₂	ヤギFab'-GOD	"	5
	77I(ニティ)ヤギFab'(ab') ₂	ヤギFab'-GOD	"	5
	77I(ニティ)ヤギFab'(ab') ₂	ヤギFab'-GOD	"	8
比較例	ヤギFab'(ab') ₂	ヤギFab'-GOD	"	10
	ヤギFab'(ab') ₂	ヤギFab'-GOD	"	10
	ヤギFab'(ab') ₂	ヤギFab'-GOD	"	10
	ヤギFab'(ab') ₂	ヤギFab'-GOD	"	10
	ヤギIgG	ヤギFab'-GOD	"	20
例	ヤギIgG	ヤギFab'-GOD	"	15
	ヤギIgG	ヤギFab'-HRP	健常	30

(* F検定)

第1表より、化学発光法による測定は、比色法による測定より感度がよく、低濃度まで測定することができた。

また、固相抗体にアフィニティ処理を行った抗G-CSF抗体を使用した場合、固相抗体にアフィニティ処理を行っていないものよりさらに低濃度まで測定することができた。

実施例2

実施例1(B)の固相抗体の精製において、固相が浸漬される抗G-CSF抗体の浸漬液濃度と検出限界との関係を調べた。

① アフィニティ精製されたヤギ抗G-CSF Fab'(ab')₂を 0.1 mol/l のホウ酸緩衝液(pH 8.5)で次の各濃度に希釈した。

濃度： $0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 25(\mu\text{g/ml})$

② ①の各濃度の溶液中にポリスチレンビーズ($\phi = 6.5\text{ mm}$)を浸漬し、一晩静置した。

③ ②の固相を $0.1\% \text{ BSA}$ を含む 0.1 mol/l ホウ酸緩衝液(pH 8.5)で洗浄して各浸漬液濃度に対する固相抗体を得た。

④ 次に標識酵素としてGOD、抗体としてアフィニティ精製されたヤギ抗G-CSF Fab'およびアフィニティ精製されていないヤギ抗G-CSF Fab'を用い実施例1(C)に示す方法で酵素標識抗体を得た。

⑤ ②および③の固相抗体、酵素標識抗体を用いて実施例1(D)の方法によりG-CSFの検出限界を測定した。結果を第2図に示す。

なお、固相抗体、酵素標識抗体およびG-CSFの抗原抗体反応はリン酸緩衝液(pH 7.0)中、

振とう状態で行った。

第2図より、浸漬液濃度が $0.3\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ ～ $1.0\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ であるとき $5\text{ pg}/\text{ml}$ 以下、特に $5\text{ pg}/\text{ml}$ 以下の濃度のG-CSFの測定をすることができる。

実施例3

実施例1(D)の抗原抗体反応において、固相抗体とG-CSFの反応をリン酸緩衝液中、振とう状態で行う場合と、ホウ酸緩衝液を用いた場合で行ったものについて、化学発光法によるG-CSFの検出限界を比較した。

固相抗体 アフィニティヤギ抗G-CSF F(ab')

標識抗体 GOD標識アフィニティヤギ抗G-CSF Fab'

(以下余白)

の溶液、標準抗原(1.0, 5.0, 10, 25, 50 pg/ml)からなるG-CSF測定用キットを作成した。

実施例5

(A) 抗IL-2抗体のアフィニティ精製処理 CNBr-セファロース4B(ファルマシア社製)にIL-2をカップリングさせたものを充てん剤とし、カラムに抗IL-2 IgG分画(コラボレーティブ社製)の溶液を流し込み、カラム内に残った抗IL-2 IgGを回収して、この抗IL-2 IgGから抗IL-2 F(ab')₂および抗IL-2 Fab'を得る。

(B) 固相抗体の調製

① 上記(A)でアフィニティ精製された抗IL-2 F(ab')₂を含むホウ酸緩衝液(pH

第2表

試験No.	緩衝液	振とう	検出限界(pg/ml)
1	リン酸	あり	1
2	"	なし	4
3	ホウ酸	あり	5
4	"	なし	8

第2表より、リン酸緩衝液中、振とう状態で抗原抗体反応を行うと、さらに検出限界を低下させ、低濃度まで測定することができる。

実施例4

6.5 mMのポリスチレンボールを $0.3\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ ～ $1.0\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ のアフィニティ精製抗G-CSF抗体溶液に浸漬して調製した固相抗体、マレイミド法により調製したGOD標識抗G-CSF抗体

B.5)中に、固相としてポリスチレンビーズ($\phi = 6.5\text{ }\mu\text{m}$)を浸漬し、一晩静置する。

② 次に①の固相をウシ血清アルブミン(BSA)を含むホウ酸緩衝液で洗浄して、アフィニティ精製された抗IL-2 F(ab')₂の固相抗体を得る。

(C) 酵素標識抗体の調製

標識物質としてGODを用い、マレイミド法により調製を行う。すなわち、

① マレイミド化

GODを含む 0.1 mol/l のリン酸緩衝液(pH 7.0)に架橋剤を含むジメチルホルムアミド溶液を加え、GODにマレイミド基を導入する。

②(i) 上記(A)で得られたアフィニティ精製された抗IL-2 Fab'を含むリン酸緩

衝液 (0.1 mol/l, pH 6.0) に β -メルカプトエチルアミン 1.1 mg、EDTA 5 nmol/l 含む 0.1 mol/l リン酸緩衝液 (pH 6.0) を加えて、37°C の温度で搅拌を行う。

(ii) 次にセファデックス G-2.5 を充てんした PD-10 カラム (ファルマシア社製) で脱塩を行う。

④ GOD 標識抗 IL-2 抗体の調製

(i) ①のマレイミド化 GOD 3 mg を含む 0.1 mol/l リン酸緩衝液 (pH 6.0) に ②の抗 IL-2 Fab' 5.4 mg を含む 0.1 mol/l リン酸緩衝液を加え、

(ii) さらに 0.1 mol/l リン酸緩衝液 (pH 6.0) を加える。30°C の温度で搅拌を行い、4°C で静置する。

し 0.5 mol/l のグルコースを添加し、標識酵素の GOD と反応させる。

⑤ ④の溶液に 0.15 N の HCl を加えた後サンプリングを行い、この溶液に 2×10^{-3} mol/l ルミノール溶液および 8×10^{-3} mol/l の K₃Fe(CN)₆ 溶液を加え、16S ~ 45S 後の発光量をルミノメータ (明電舎製) で測定し、IL-2 の検出限界を測定する。

この系を用いると検出限界 1 ~ 10 (pg/ml) の IL-2 の測定ができる。

実施例 6

6.5 mmφ ポリスチレンボールを 0.3 μg/ml ~ 10 μg/ml のアフィニティ精製抗 IL-2 抗体溶液に浸漬して調製した固相抗体、マレイミド法により調製した GOD 標識抗 IL-2 抗体の溶

(iii) 上記(ii)の混合溶液を TSK G 3000 SW (東ソー社製) カラムで精製し、GOD 標識抗 IL-2 抗体を得る。

(D) 上記(B) で得た固相抗体および(C)で得た GOD 標識抗体を用いて、次の手順で抗原抗体反応を行った後、化学発光法により IL-2 の検出限界を測定する。

① IL-2 溶液に上記(B) で得た固相抗体を添加する。

② さらにリン酸緩衝液 (pH 7.0) を加え、固相抗体と、IL-2 との抗原抗体反応を行う。

③ 次に固相を洗浄し、(C) で得た GOD 標識抗体を加えて固相に結合している IL-2 と抗原抗体反応を室温で行う。

④ 次に③の固相を洗浄し、別の試験管に移

し 0.5 mol/l のグルコースを添加し、標識酵素の GOD と反応させる。

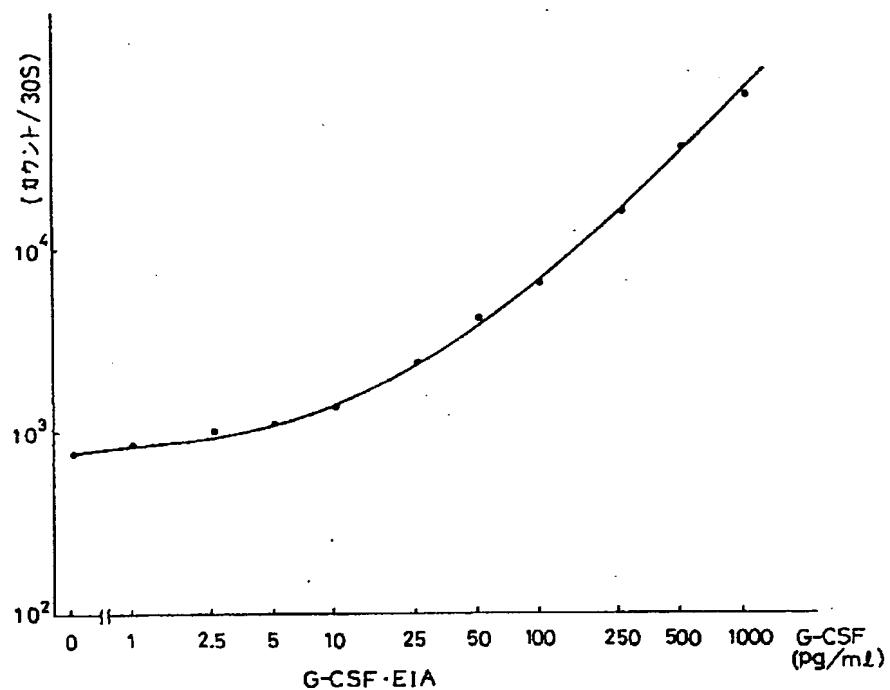
H. 発明の効果

本発明は、アフィニティ精製された固相抗体を使用し、抗原抗体反応を利用して、発光法によりサイトカインの濃度を測定することとしたので、測定限界を従来のものに比し低下することができ数 pg/ml 単位の極微量のサイトカインの検出も可能である。

4. 図面の簡単な説明

第 1 図は、G-CSF の検出限界を示すグラフ、第 2 図は固相の浸漬液濃度に対する G-CSF の検出限界を示すグラフである。

第1図
G-CSF-EIAの検量線



第2図
固相浸漬液濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)

